

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. Februar 2002 (21.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/14873 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/68**

(74) Anwalt: **HELDT, Gert**; Grosse Bleichen 12 I, 20354 Hamburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03089

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, BR, CA, CN, CO, CZ, EE, HU, IL, IN, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RU, SG, SK, US, ZA.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
11. August 2001 (11.08.2001)

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(30) Angaben zur Priorität:  
100 40 904.0 18. August 2000 (18.08.2000) DE

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **BÖGER, Rainer, H.** [DE/DE]; Hartwicusstr. 2, 22087 Hamburg (DE).



WO 02/14873 A2

(54) **Title:** METHODS AND AGENTS FOR DETECTING THE PROBABILITY OF THE FUTURE OCCURRENCE OR PROGRESSION OF DISEASES THAT ARE ASSOCIATED WITH A DISORDER OF THE NO METABOLISM

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN UND MITTEL ZUM NACHWEIS EINER WAHRSCHEINLICHKEIT DES ZUKÜNFTIGEN AUFTRETENS ODER FORTSCHREITENS VON ERKRANKUNGEN, DIE MIT EINER STÖRUNG DES NO-STOFFWECHSELS EINHERGEHEN

(57) **Abstract:** The invention relates to methods and agents for detecting the probability of the future occurrence or progression of diseases that are associated with a disorder of the NO metabolism.

(57) **Zusammenfassung:** Verfahren und Mittel zum Nachweis einer Wahrscheinlichkeit des zukünftigen Auftretens oder Fortschreitens von Erkrankungen, die mit einer Störung des NO-Stoffwechsels einhergehen.

## Beschreibung

"Verfahren und Mittel zum Nachweis einer Wahrscheinlichkeit des zukünftigen Auftretens oder Fortschreitens von Erkrankungen, die mit einer Störung des NO-Stoffwechsels einhergehen."

Die Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis einer Wahrscheinlichkeit des zukünftigen Auftretens oder Fortschreitens von Erkrankungen, die mit einer Störung des NO-Stoffwechsels einhergehen. Darüberhinaus betrifft die Erfindung Mittel zum Nachweis von endogenen Methyl-Argininen in biologischen Flüssigkeiten.

Die endogenen Methyl-Arginine ADMA und SDMA sind Derivate der Aminosäure L-Arginin. L-Arginin ist die Vorstufe zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) im menschlichen Körper. NO wiederum ist ein wichtiger physiologischer Mediator im Herz-Kreislaufsystem und in anderen Organsystemen, der an der Regulation von Blutdruck und Gefäßwiderstand, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, Adhäsion von Leukozyten und Monozyten und der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt ist (Böger et al., Atherosclerosis 1996; 127: 1-11). NO spielt auch eine wichtige physiologische Rolle bei der Erektion. Bei Herz-Kreislaufkrankungen wie Arteriosklerose, Hypercholesterinämie, Hypertonie, chronischer Herzinsuffizienz, bei Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, bei Präeklampsie, bei erektiler Dysfunktion und anderen Erkrankungen kommt es zur Abschwächung der biologischen Wirkungen von NO, wodurch das Fortschreiten dieser Erkrankungen und der begleitenden Gefäßläsionen beschleunigt wird. Durch Gabe von L-Arginin kann diesem Geschehen entgegengewirkt werden.

In mehreren klinischen und experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß es bei den genannten Erkrankungen zu einem Ansteigen der

Konzentration des endogenen L-Arginin-Analogons ADMA im Plasma oder Serum kommen kann. Erhöhte Konzentrationen von ADMA wurden gefunden bei peripherer arterieller Verschlusskrankung (Böger et al., Circulation 1997; 95: 2068-2074), bei Hypercholesterinämie (Böger et al., Circulation 1998; 98: 1842-1847), bei Hypertonie (Surdacki et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 1999; 33: 652-658), bei chronischer Niereninsuffizienz (Kielstein et al., J. Am. Soc. Nephrol. 1999; 10: 594-600) und bei chronischer Herzinsuffizienz. Eine Ursachen-Wirkungsbeziehung zwischen erhöhten ADMA-Konzentrationen und diesen Erkrankungen konnte aus den Ergebnissen dieser Studien jedoch nicht abgeleitet werden. ADMA ist ein Inhibitor der Bildung von NO aus L-Arginin, die durch das Enzym NO-Synthase in Endothelzellen vermittelt wird. Somit wäre erklärlich, daß die erhöhten Konzentrationen von ADMA durch Hemmung der NO-Bildung zum Fortschreiten des Krankheitsprozesses beitragen könnten. Auch erhöhte Blut-Glucose-Konzentrationen, wie sie beim Diabetes mellitus auftreten, führen zu verminderter Wirkung von NO, wodurch das Auftreten von Komplikationen des Herz-Kreislaufsystems gefördert wird. Bei der Präeklampsie kommt es durch die Störung des NO-Stoffwechsels zu einer Verengung von Arterien, die einen Bluthochdruck bei der Mutter auslöst und durch Minderdurchblutung der Plazenta zur Gefährdung des ungeborenen Kindes führt. Ferner ist ein Mangel der Wirkungen von NO eine wesentliche Ursache der erektilen Dysfunktion. Dagegen ist SDMA zwar ebenfalls ein endogen vorkommendes Molekül, welches aber offenbar keine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der NO-Synthase ausübt.

Der Erfindung liegt die Beobachtung zugrunde, daß Patienten mit Hypercholesterinämie, peripherer Arteriosklerose, Herzinsuffizienz, chronischer Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus und Hypertonie höhere Konzentrationen von ADMA im Plasma aufweisen als gesunde Probanden. Wir haben nunmehr erstmals zeigen können, daß ADMA ein für das zukünftige Fortschreiten der Erkrankungen prognostisch relevanter Faktor ist: Patienten mit höheren ADMA-Konzentrationen haben eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit, eine bedrohliche Durchblutungsstörung zu erleiden oder daran zu versterben als Patienten mit niedrigeren ADMA-Konzentrationen (Beispiel 1). Patienten mit hohen ADMA-Konzentrationen haben auch insgesamt ein signifikant höheres Risiko zu versterben, unabhängig von der zugrundeliegenden Todesursache (Beispiel 2). Ferner findet sich bei Patienten mit höheren ADMA-Konzentrationen signifikant häufiger eine Verdickung der Arterienwand in der Halsschlagader (A. carotis) als bei Patienten mit niedrigen ADMA-Konzentrationen (Beispiel 3). Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, die erhöhte ADMA-Konzentrationen aufweisen, haben eine

geringere maximale Sauerstoffaufnahme unter körperlicher Belastung – ein Hinweis auf eine ungünstige Prognose des zukünftigen Krankheitsverlaufs (Beispiel 4).

Da ADMA somit ein für den Krankheitsverlauf der genannten Erkrankungen relevanter Faktor ist, ist es nützlich, die Konzentration beim individuellen Patienten mittels eines universell verfügbaren und raschen diagnostischen Tests spezifisch messen und sie von der SDMA-Konzentration unterscheiden zu können.

Die derzeit verfügbaren Meßverfahren zur quantitativen Bestimmung von ADMA und SDMA in Plasma, Serum, Urin und anderen biologischen Flüssigkeiten (Gewebeextrakten, Zellkulturüberständen u.a.) basieren allesamt auf dem chemischen Nachweisverfahren der Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie (HPLC). Verschiedene Modifikationen von HPLC-Methoden werden hierzu derzeit eingesetzt. Diese Methoden sind jedoch sehr zeit- und personalintensiv, teuer, und somit für die klinische Routinediagnostik nicht geeignet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Wahrscheinlichkeit des zukünftigen Fortschreitens von Erkrankungen nachzuweisen, die mit einer Störung des NO-Stoffwechsels einhergehen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Gehalt von endogenen Methyl-Argininen in biologischen Flüssigkeiten bestimmt wird.

Trotz der sehr umfänglichen Bestimmung verschiedenster bisher bekannter kardiovaskulärer Risikofaktoren ist bei einem Anteil von Patienten trotz Fehlens solcher bisher bekannter Risikofaktoren ein Fortschreiten der genannten Erkrankungen nachzuweisen. Die Erfindung weist den Vorteil auf, daß zumindest ein Teil dieser Fälle durch das Vorliegen erhöhter Konzentrationen der endogenen Methyl-Arginine erklärt werden kann und somit eine verbesserte Prognose über den Krankheitsverlauf abgegeben werden kann.

Die bisher eingesetzten Nachweisverfahren für ADMA und SDMA basieren auf dem Prinzip der HPLC, was sie sehr aufwendig und teuer macht, so daß diese Verfahren nicht umfassend in klinischen Alltag eingesetzt werden können, sondern spezialisierten Forschungslabors vorbehalten bleiben. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Verfahren vorzulegen, mit dessen Hilfe einfach, kostengünstig und universell klinisch nutzbar die endogenen Methyl-Arginine ADMA und SDMA quantitativ in biologischen Flüssigkeiten bestimmt werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß zur Bestimmung des Gehaltes von endogenen Methyl-Argininen in einer biologischen Flüssigkeit auf diese mit Antikörpern eingewirkt wird.

Die Bestimmung der ADMA- und SDMA-Konzentrationen mittels immunochemischer Verfahren (d.h. unter Verwendung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern) hat erfindungsgemäß wesentliche Vorteile:

1. Die Messung der ADMA- und SDMA-Konzentrationen mittels Verwendung antikörperbasierter Verfahren muß nicht in hochspezialisierten HPLC-Labors durchgeführt werden. Immunochemische Nachweisverfahren wie Radioimmunoassays, Enzymimmunoassays etc. sind in den meisten klinisch-chemischen Labors routinemäßig verfügbar.
2. Die Messung mit immunochemischen Nachweisverfahren dauert weniger lange als die Messung mittels HPLC. Für letzteres Verfahren ist eine aufwendige Probenextraktion aus der jeweiligen Matrix (Plasma, Serum, Urin o.a.) erforderlich, damit die Messung per HPLC erfolgen kann. Das rasche Vorliegen des Meßwertes ist aber für die Verwendung des ADMA- bzw. SDMA-Nachweises im klinischen Alltag unabweisbar notwendig, damit dieser Parameter als Krankheits-Marker breite Akzeptanz finden kann.
3. Immunochemische Nachweisverfahren können neben der klinischen Routine auch in experimentellen Anwendungen zum Einsatz kommen (z.B. Immunohistochemie, Immunozytochemie, Immunoblotting).
4. Entsprechend der vorliegenden Erfindung ist der diagnostische Nachweis von ADMA bzw. SDMA geeignet, um prospektiv über das Erkrankungs- oder Todes-Risiko eines Patienten Aufschluß zu erlangen ("Risikofaktor").

Die Erzeugung monoklonaler Antikörper erfolgt nach allgemein bekannten immunologischen Verfahren durch Fusion von immunkompetenten Zellen sensibilisierter Versuchstiere mit Myelomzellen und Selektion der die spezifischen Antikörper produzierenden Zellklone mittels Standardverfahren. Die Erzeugung polyklonaler Antikörper erfolgt mittels Gewinnung von Immuns serum von immunisierten Versuchstieren nach allgemein bekannten Verfahren. Die Produktion monoklonaler Antikörper gegen ADMA und SDMA umfaßt die Kultivierung der Antikörper-produzierenden Zellklone, die Gewinnung des Antikörper-enthaltenden konditionierten Mediums, sowie die Abfüllung und den Vertrieb der Antikörperlösungen. Die Nutzung der Antikörper umfaßt ihren Einsatz zu diagnostischen und wissenschaftlichen Zwecken, als Antikörper-Suspension oder als

Bestandteil eines diagnostischen Kits, in den Bereichen der klinischen Medizin, der experimentellen Medizin, der Veterinärmedizin, der Biologie und anderer Biowissenschaften.

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung:

### **Beispiel 1**

225 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz wurden in eine klinische Studie aufgenommen. Zu Beginn der Studie wurde jedem Patienten eine Blutprobe entnommen, in der die Konzentrationen von ADMA und SDMA sowie von L-Arginin bestimmt wurden. Die Patienten wurden über eine mittlere Beobachtungsdauer von 26 Monaten (1 – 35 Monaten) nachbeobachtet. Während dieser Zeit erlitten 57 Patienten ein kardiovaskuläres Krankheitsereignis (Myokardinfarkt, Schlaganfall, periphere Durchblutungsstörung oder kardial bedingter Tod). Patienten mit einem solchen kardiovaskulären Krankheitsereignis hatten zu Beginn der Studie signifikant höhere ADMA-Konzentrationen gehabt (Median 3,2  $\mu\text{mol/L}$ ) als Patienten ohne solches Ereignis (Median 2,2  $\mu\text{mol/L}$ ). ADMA erwies sich in der statistischen Analyse als ein unabhängiger Prädiktor kardiovaskulärer Krankheitsereignisse. Wurden die Patienten anhand der zu Beginn der Studie gemessenen ADMA-Plasmakonzentrationen in Gruppen eingeteilt (ADMA < 50. Perzentile, 51. – 70. Perzentile, 71. – 90. Perzentile, und >90. Perzentile), so ergab sich eine klare Zunahme der Inzidenz kardiovaskulärer Todesfälle mit steigender ADMA-Konzentration (Abbildung 1).

### **Beispiel 2**

Bei 225 Patienten, bei denen in einer zu Beginn der Studie abgenommenen Blutprobe die ADMA-Konzentration bestimmt worden war, traten im Verlauf einer im Mittel 26 Monate dauernden Nachbeobachtungsphase insgesamt 57 Todesfälle aufgrund verschiedenster Ursachen auf. Patienten, die im Verlauf der Studie verstarben, hatten zu Beginn signifikant höhere ADMA-Konzentrationen aufgewiesen (Median 3,5  $\mu\text{mol/L}$ ) als Patienten, die überlebten (2,3  $\mu\text{mol/L}$ ). ADMA erwies sich als ein von anderen Risikofaktoren unabhängiger Prädiktor des Überlebens. Wurden die Patienten anhand der zu Beginn der Studie gemessenen ADMA-

Plasmakonzentrationen in Gruppen eingeteilt (ADMA < 50. Perzentile, 51. – 70. Perzentile, 71. – 90. Perzentile, und >90. Perzentile), so ergab sich eine klare Zunahme der Gesamtmortalität mit steigender ADMA-Konzentration (Abbildung 2).

### **Beispiel 3**

Bei 90 Patienten wurde in einer Plasmaprobe die ADMA-Konzentration bestimmt. Anschließend wurde bei diesen Patienten mittels hochauflösender Ultraschalluntersuchung die Wanddicke der Halsschlagader (A. carotis) vermessen. ADMA war ein unabhängiger Einflußfaktor für die Intima/Media-Dicke der A. carotis (Abbildung 3), für die luminale Querschnittsfläche, und für den Schweregrad der arteriosklerotischen Läsionen in der A. carotis.

### **Beispiel 4**

Bei 45 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz wurde eine Blutprobe entnommen. Die Messung der ADMA-Konzentration ergab einen mittleren Wert von  $4,1 \pm 0,8 \mu\text{mol/l}$ , im Vergleich zu  $1,0 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$  bei gesunden Kontrollpersonen. Patienten mit höheren ADMA-Konzentrationen hatten eine geringere NO-vermittelte Gefäßdilatation ( $R = -0.79$ ) und eine geringere maximale Sauerstoffaufnahme unter körperlicher Belastung ( $R = -0.81$ ; Abbildung 2a). Die Gabe von L-Arginin führte zu einer signifikanten Verbesserung der NO-vermittelten Gefäßdilatation; das Ausmaß dieser Verbesserung durch L-Arginin war umso größer, je höher die ADMA-Konzentration beim jeweiligen Patienten war ( $R = 0.74$ ; Abbildung 2b).

## Patentansprüche

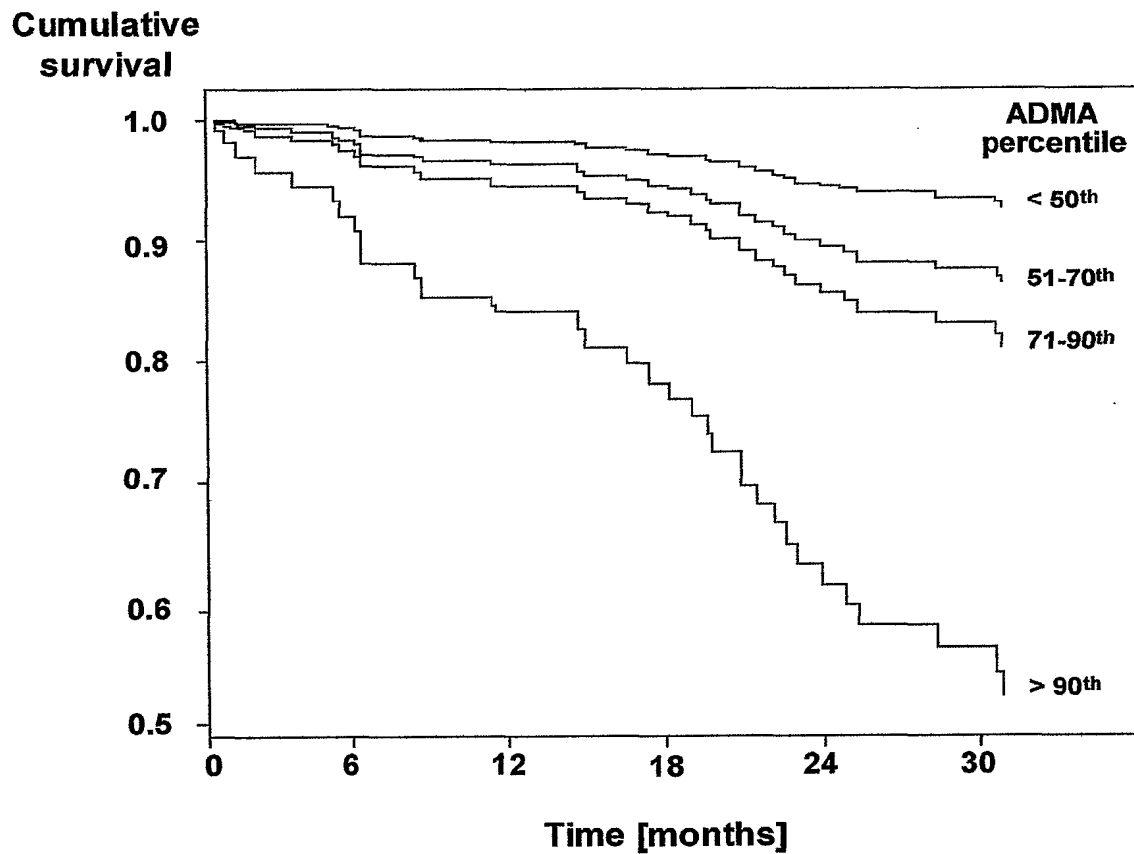
1. Verfahren zum Nachweis einer Wahrscheinlichkeit des zukünftigen Auftretens oder Fortschreitens von Erkrankungen, die mit einer Störung des NO-Stoffwechsels einhergehen, dadurch gekennzeichnet, dass ein Gehalt von endogenen Methyl-Argininen in einer biologischen Flüssigkeit nachgewiesen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung eine koronare Herzkrankheit ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung eine chronische Herzinsuffizienz ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung eine erektile Dysfunktion ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung eine periphere arterielle Durchblutungsstörung ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung eine chronische Niereninsuffizienz ist.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung eine zerebrale ischämische Erkrankung ist.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung ein Diabetes mellitus ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung eine Präeklampsie ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß festgestellt wird, wie hoch in der biologischen Flüssigkeit eine Konzentration von ADMA ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß festgestellt wird, wie hoch in der biologischen Flüssigkeit ein Verhältnis der Konzentrationen von L-Arginin zu ADMA ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß festgestellt wird, wie hoch in der biologischen Flüssigkeit eine Konzentration von SDMA ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß festgestellt wird, wie hoch in der biologischen Flüssigkeit ein Verhältnis der Konzentrationen von L-Arginin zu SDMA ist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß festgestellt wird, wie hoch in der biologischen Flüssigkeit ein Verhältnis der Konzentrationen von ADMA zu SDMA ist.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung des Gehaltes von endogenen Methyl-Argininen in einer biologischen Flüssigkeit auf diese mit Antikörpern eingewirkt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß mit monoklonalen Antikörpern auf die das endogene Methyl-Arginin enthaltende biologische Flüssigkeit eingewirkt wird.
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß mit polyklonalen Antikörpern auf die das endogene Methyl-Arginin enthaltende biologische Flüssigkeit eingewirkt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die monoklonalen Antikörper durch Kultivierung der Antikörper-produzierenden Zellklone und Gewinnung einer die Antikörper enthaltenden Lösung gewonnen werden.
19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die polyklonalen Antikörper durch Gewinnung von Immuns serum von immunisierten Versuchstieren erzeugt werden.
20. Mittel zur Durchführung der Verfahren 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische Flüssigkeit aus Plasma besteht.
21. Mittel zur Durchführung der Verfahren 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische Flüssigkeit aus Serum besteht.
22. Mittel zur Durchführung der Verfahren 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische Flüssigkeit aus Urin besteht.

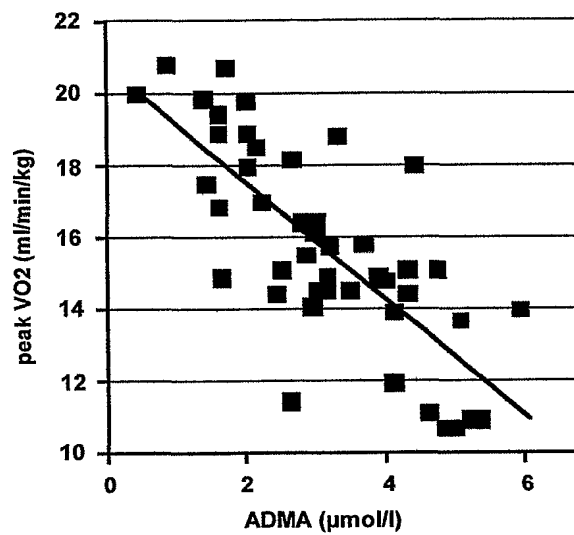
23. Mittel zur Durchführung der Verfahren 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische Flüssigkeit aus Gewebsextrakten besteht.
24. Mittel zur Durchführung der Verfahren 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische Flüssigkeit aus histologischen Präparaten besteht.
25. Mittel zur Durchführung der Verfahren 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische Flüssigkeit aus zytologischen Präparaten besteht.

Abbildung 1



**Abbildung 2**

a.



b.

